

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

⑪ N° de publication :

2 328 045

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

⑫

N° 76 29746

⑤④ Procédé de production d'acide clavulanique.

⑤① Classification internationale (Int. Cl.²). C 12 D 1/02; C 07 D 263/56//A 61 K 31/42.

②② Date de dépôt 4 octobre 1976, à 14 h 37 mn.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée en Grande-Bretagne le 13 octobre 1975, n. 41.898/1975 au nom de la demanderesse.*

④① Date de la mise à la disposition du public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 19 du 13-5-1977.

⑦① Déposant : Société dite : BEECHAM GROUP LIMITED, résidant en Grande-Bretagne.

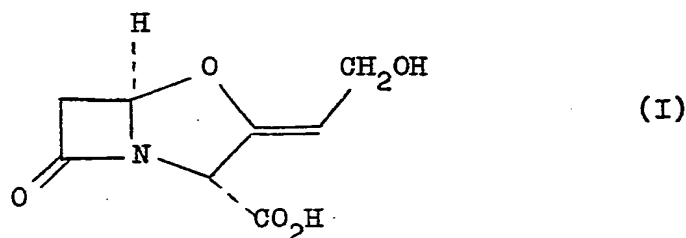
⑦② Invention de :

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Cabinet Pruvost, 31, boulevard Gutenberg, 93190 Livry-Gargan.

La présente invention est relative à la production d'acide clavulanique et de ses sels par fermentation de Streptomyces jumonjinensis.

L'acide clavulanique qui est un composé antibactérien
5 utile de formule (I) :



10 et ses sels et esters sont décrits dans le brevet belge n° 827.926. Le brevet belge n° 827.926 décrit également la préparation de l'acide clavulanique et de ses dérivés par fermentation de
15 Streptomyces clavuligerus.

Le Streptomyces jumonjinensis a été décrit dans le brevet belge n° 804.341 comme produisant un agent antibactérien autre que l'acide clavulanique. Les recherches ayant abouti à l'invention ont montré que de l'acide clavulanique est également produit lors de la
20 culture de Streptomyces jumonjinensis.

En conséquence, la présente invention a pour objet un procédé de préparation de l'acide clavulanique et de ses sels, caractérisé en ce qu'on effectue la culture d'une souche de Streptomyces jumonjinensis et en ce qu'on récupère l'acide
25 clavulanique ou son sel à partir de la culture.

Judicieusement, l'acide clavulanique est récupéré sous forme de ses sels solides de lithium, sodium, potassium, calcium, magnésium, baryum, aluminium, ammonium ou ammonium substitué. Comme sels d'ammonium substitué de manière appropriée, on peut
30 mentionner les sels d'ammonium primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire.

Judicieusement, l'acide clavulanique est récupéré sous forme de son sel de métal alcalin solide, tel que son sel de sodium ou de potassium.

35 Par l'expression "sels solides de l'acide clavulanique", on entend les sels cristallins et les sels amorphes de l'acide clavulanique. Judicieusement, les sels de l'acide clavulanique

sont obtenus sous forme de sels cristallins, par exemple sous forme de sel cristallin constitué par le clavulanate de sodium tétrahydraté ou les sels cristallins de potassium ou de lithium.

De préférence, on utilise Streptomyces jumonjinensis
5 NRRL 5741 ou un mutant de ce microorganisme au cours du procédé selon l'invention.

Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 a également été déposé à Baarn aux Pays-Bas sous la référence CBS 177.76, et à la collection allemande de Microorganismes DSN.

10 Lorsqu'on utilise dans la présente description le terme "culture", il désigne le développement aérobic délibéré d'un organisme produisant de l'acide clavulanique en présence de sources assimilables de carbone, d'azote et de sels minéraux. Un tel développement ou croissance aérobic peut avoir lieu dans un milieu
15 nutritif solide ou semi-solide, ou dans un milieu liquide dans lequel les substances nutritives sont dissoutes ou en suspension. La culture peut avoir lieu sur une surface aérobic ou par culture immergée. Le milieu nutritif peut être composé de substances nutritives complexes ou peut être défini chimiquement.

20 Le brevet belge n° 804.341 décrit les conditions générales de la culture de Streptomyces jumonjinensis.

La Demanderesse a constaté que des milieux contenant des substances nutritives complexes telles que de l'extrait de levure, de la farine de graines de soja et des substances analogues sont
25 particulièrement appropriées.

Les milieux nutritifs qui ont été utilisés pour la culture de Streptomyces jumonjinensis peuvent contenir de 0,1 à 10% d'une source d'azote complexe organique telle que de l'extrait de levure, de la liqueur de macération de maïs, de la protéine végétale, de la
30 protéine de graines, des produits d'hydrolyse de ces protéines, des produits d'hydrolyse de protéines du lait, des extraits de poisson et de viande et des produits d'hydrolyse tels que des peptones. En variante, on peut utiliser des sources d'azote chimiquement définies, telles que de l'urée, des sels d'ammonium, des amides, des
35 amino-acides courants seuls ou en mélanges, tels que la valine, l'asparagine, l'acide glutamique, la proline et la phénylalanine. On peut inclure de l'hydrate de carbone (de 0,1 à 5%) dans les milieux nutritifs. L'amidon ou les produits d'hydrolyse de l'amidon

tels que la dextrine, la saccharose, le lactose ou d'autres sucres ou le glycérol ou les esters de glycérol peuvent aussi être utilisés. Les sources de carbone peuvent aussi provenir d'huiles végétales ou de graisses animales. Les acides carboxyliques et leurs sels peuvent être inclus comme source de carbone pour la croissance et la production d'inhibiteurs de β -lactamase.

L'addition d'agents anti-mousse (tels que Pluronic L81) peut être nécessaire pour combattre la formation de mousse de certains milieux dans des fermenteurs.

10 On peut ajouter des sels minéraux tels que NaCl, KCl, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, $FeCl_3$, Na_2SO_4 , $FeSO_4$, $MgSO_4$ et des sels de Na^+ ou K^+ de l'acide phosphorique aux milieux décrits ci-dessus, en particulier s'ils sont chimiquement définis ; $CaCO_3$ peut être ajouté comme source d'ions Ca^{++} ou pour son action tampon.

15 Des sels d'oligo-éléments tels que le nickel, le cobalt ou le manganèse peuvent aussi être inclus. On peut ajouter des vitamines si désiré.

Lorsqu'on utilise dans la présente description le terme "mutant", on entend toute souche de mutant qui est obtenue spontanément ou par l'effet d'un agent externe, que cet agent externe soit appliqué délibérément ou d'une autre manière. Comme procédés appropriés à la production des souches de mutants, on peut mentionner les procédés décrits dans le brevet belge n° 827.926.

20 La culture de Streptomyces jumonjinensis a normalement lieu entre une température comprise entre 16 et 35°C, habituellement entre 20 et 32°C, et de préférence entre 25 et 30°C, par exemple d'environ 27°C, et à un pH compris entre 5 et 8,5 et plus judicieusement entre 6 et 7,5.

30 Le Streptomyces jumonjinensis peut être cultivé dans les milieux ci-dessus dans des récipients classiques tels que des flacons coniques en verre aérés par agitation, par exemple en les secouant sur un dispositif de secouage rotatif ou dans des fermenteurs aérés, par exemple dans des fermenteurs en acier inoxydable à chicanes agités au moyen de roues à aubes et aérés au moyen d'un dispositif d'aération. La fermentation peut aussi être effectuée de manière continue.

35 Le pH de départ de la fermentation est, de manière typique, de 7,0, et le rendement maximal en acide clavulanique est obtenu en

1 à 10 jours entre 20 et 32°C, par exemple en 2 à 5 jours.

L'acide clavulanique sous forme de ses sels peut être extrait du filtrat de culture par divers procédés, comme ceux décrits dans le brevet belge n° 827.926. L'extraction par un solvant du filtrat de culture froid réglé à des valeurs de pH acides et les procédés basés sur la nature anionique du métabolite, tels que l'utilisation de résines échangeuses d'anions, se sont révélés particulièrement utiles. On élimine normalement d'abord les cellules de Streptomyces jumonjinensis du milieu de fermentation par filtration ou centrifugation avant de commencer les opérations d'extraction.

Dans le procédé d'extraction au moyen d'un solvant, le filtrat de culture est refroidi et le pH abaissé à une valeur de l'ordre de 2 à 3 par l'addition d'un acide, tandis qu'on mélange intimement avec un solvant organique non miscible à l'eau tel que l'acétate de n-butyle, la méthylisobutylcétone, le n-butanol ou l'acétate d'éthyle. L'acide utilisé pour abaisser le pH du milieu est normalement un acide minéral tel que les acides chlorhydrique, sulfurique, nitrique, phosphorique ou un acide analogue. Le n-butanol est un solvant particulièrement approprié à une utilisation dans l'extraction du filtrat acidifié de la culture. Après séparation des phases par centrifugation, le métabolite constitué par l'acide clavulanique est extrait à nouveau de la phase de solvant au moyen de bicarbonate de sodium aqueux ou de tampon de phosphate acide de potassium, d'une suspension de CaCO_3 ou d'eau, tandis qu'on maintient le pH sensiblement à neutralité, par exemple à pH 7,0. Cet extrait aqueux peut être concentré, après séparation des phases, sous pression réduite et lyophilisé avec obtention d'une préparation brute d'un sel d'acide clavulanique. Cette préparation est stable lorsqu'elle est stockée sous forme d'un solide sec à -20°C.

Dans le procédé avec résine échangeuse d'anions, on met en contact le filtrat de la culture, à un pH approximativement neutre ou légèrement acide, par exemple de 6 à 7, avec un lit d'une résine échangeuse d'anions à base faible ou forte, telle que la résine Amberlite IR4B ou Zerolit FFIP, habituellement jusqu'à ce que la résine soit saturée et que la matière formée par l'acide clavulanique émerge du lit. On lave alors le lit à l'eau et on élue au

- moyen d'une solution saline aqueuse, telle qu'une solution de chlorure alcalin, par exemple de chlorure de sodium. Les fractions contenant de l'acide clavulanique sont recueillies, réunies en une masse, débarrassées du sel et lyophilisées de manière à obtenir un
- 5 sel solide brut de l'acide clavulanique. L'Amberlite IR4B est un exemple d'une résine échangeuse d'anions faiblement basique avec des groupes polyamine actifs et un support de polystyrène-divinylbenzène réticulé. Comme autres résines échangeuses d'anions faiblement basiques, on peut mentionner l'Amberlite IRA68 et IRA93.
- 10 Le Zérolit FFIP est une résine échangeuse d'anions fortement basique, avec des groupes actifs d'ammonium quaternaire et un support de polyvinyl-divinylbenzène réticulé. Les résines équivalentes à Zérolit FFIP comprennent l'Isopor FFIP et le DeAcidite FFIP SRA 64, 61 et 62.
- 15 Une variante du procédé d'extraction consiste à mettre en contact le filtrat de la culture (habituellement à un pH à peu près neutre) contenant un sel de l'acide clavulanique avec une phase organique dans laquelle est dissoute une amine insoluble dans l'eau. Comme solvants organiques appropriés, on peut mention-
- 20 ner des solvants polaires classiques non miscibles à l'eau tels que la méthylisobutylcétone, le trichloréthylène et les solvants analogues. Comme amines appropriées, on peut mentionner les amines secondaires ou tertiaires dans lesquelles l'un des groupes substituants est un groupe aliphatique à longue chaîne, ayant par
- 25 exemple de 12 à 16 atomes de carbone, et l'autre est un groupe alcoyle tertiaire, de sorte que la molécule est lipophile. Suivant les constatations de la Demanderesse, l'Amberlite IA2 s'est révélée comme étant une amine donnant des résultats positifs. Normalement, l'amine est utilisée sous forme de son sel d'addition
- 30 avec un acide. Après ce procédé d'extraction, l'acide clavulanique est présent dans la phase organique sous forme du sel d'amine.
- La phase organique est alors séparée du filtrat de la culture. L'acide clavulanique peut être extrait par une solution aqueuse de sel de métal alcalin, tel que le chlorure de sodium,
- 35 le nitrate de sodium ou un sel analogue. Le sel brut de l'acide clavulanique peut alors être obtenu par lyophilisation ou par un procédé analogue.

Comme autres procédés primaires d'isolement pouvant être

utilisés, on peut mentionner les procédés classiques tels que l'adsorption sur du carbone, la précipitation, le relargage et la filtration moléculaire. Ces procédés sont normalement utilisés conjointement à d'autres procédés d'isolement.

5 L'adsorption sur du carbone peut être effectuée de manière appropriée en faisant passer une solution aqueuse du filtrat de culture à travers un lit de charbon, par exemple en lui faisant descendre une colonne contenant du charbon actif. Le lit de charbon est alors lavé de manière appropriée à l'eau et ce lit est ensuite
10 élué au moyen d'un solvant aqueux miscible à l'eau, tel qu'une cétone, par exemple l'acétone, et les fractions contenant l'acide clavulanique sont retenues. Il est souvent judicieux d'éluer d'abord avec de l'acétone et ensuite avec de l'acétone aqueuse.

Il peut souvent être commode de préparer de l'acide
15 clavulanique sous forme d'un sel relativement insoluble dans l'eau, tel que le sel de lithium. Dans ce cas, la précipitation et le relargage sont des procédés utiles de préparation. La précipitation peut judicieusement être effectuée en ajoutant un solvant organique insoluble dans l'eau à une solution aqueuse du sel relativement
20 insoluble dans l'eau de l'acide clavulanique, par exemple de clavulanate de lithium. Ce procédé peut judicieusement être effectué en mettant en contact un sel de l'acide clavulanique avec un sel de lithium, soit par élution à partir d'une colonne, soit par dissolution des sels dans la même solution et addition du solvant miscible
25 à l'eau à la solution contenant le clavulanate de lithium, en précipitant ainsi ce clavulanate de lithium.

Le clavulanate de lithium peut être relargué dans une solution aqueuse contenant du clavulanate de lithium en présence d'un composé ionique de lithium, qui est judicieusement le sel de
30 lithium utilisé pour former le clavulanate de lithium, en augmentant la concentration des ions lithium dans la solution, de sorte que la solubilité du clavulanate de lithium à la température concernée est fortement dépassée. Etant donné que le clavulanate de lithium est moins soluble à des températures inférieures, le présent procédé est
35 effectué de manière appropriée à une température plus basse, par exemple comprise entre 0 et 5°C.

Une purification ultérieure des solides bruts obtenus par les procédés décrits ci-dessus peut être obtenue au moyen de divers

procédés, mais une chromatographie en colonne échangeuse d'ions est particulièrement appropriée, en particulier lorsqu'on utilise l'Isopor, le DeAcidite FFIP SRA64 ou la cellulose DEAE. La colonne de DeAcidite peut être soumise à une élution par gradients au moyen d'une solution aqueuse d'un sel tel que le chlorure de sodium (0 à 0,5 M). La colonne de DEAE-cellulose dans un tampon au phosphate 0,01M à pH 7 peut être éluée avec une solution saline, normalement une solution de chlorure de métal alcalin, telle qu'une solution de NaCl (0-0, 2M NaCl dans tampon au phosphate 0,01M à pH7). Les fractions actives peuvent être décelées par leur activité d'inhibition de la β -lactamase et leur activité sur le système KAG, toutes deux étant décrites dans le brevet belge n° 827.926.

Les fractions présentant la majeure partie de cette activité sont alors combinées et concentrées à un petit volume sous vide et débarrassées des sels.

La séparation de l'acide clavulanique et (ou) de ses sels par rapport aux sels inorganiques en particulier, mais également aux autres impuretés, peut être réalisée en adsorbant la substance anti-bactérienne sur une résine lipophile sur laquelle les sels inorganiques ne sont pas adsorbés. Suivant les constatations de la Demanderesse, un copolymère de polystyrène-divinylbenzène tel que l'Amberlite XAD-4 est particulièrement approprié ; l'antibiotique désiré peut être éliminé de la colonne par élution (élution à l'eau ou avec un alcool aqueux) et la solution résultante peut être concentrée par évaporation et lyophilisée avec obtention d'une matière de pureté améliorée. La séparation de l'acide clavulanique et (ou) de ses sels par rapport aux sels minéraux peut aussi être effectuée de manière appropriée par chromatographie sur une colonne composée d'un agent de filtration en gel, par exemple des gels de dextrane réticulés tels que Sephadex G15 et des gels de polyacrylamide tels que Biogel P2.

(Biogel P2, Sephadex G15 et Amberlite XAD-4 sont produits respectivement par Bio Rad à Richmond, Etats-Unis d'Amérique, par Pharmacia Great Britain Ltd. ; 75 Uxbridge Road, Londres W.5, Royaume-Uni et par Rohm & Haas, à Philadelphie, Etats-Unis d'Amérique).

La matière active débarrassée des sels peut être purifiée

d'avantage par chromatographie, par exemple sur une colonne de cellulose, en utilisant un système solvant à alcool aqueux, par exemple un mélange de butanol/éthanol/eau comme phase supérieure dans une proportion de 4/1/5 en volume/volume.

5 Suivant une variante du procédé de préparation d'une forme pure de l'acide clavulanique ou de ses sels, on produit une forme impure de l'acide clavulanique ou de son sel, on forme un ester de l'acide clavulanique d'une manière classique, on purifie l'ester, et ensuite on régénère l'acide clavulanique ou son sel à partir de
10 l'ester. On utilise judicieusement comme ester, selon ce mode de mise en oeuvre de l'invention, l'ester benzylique ou un ester hydrogénolysable analogue.

La forme impure de l'acide clavulanique ou de son sel qui doit être purifiée selon le présent procédé peut être sous forme
15 d'un solide ou d'une solution qui contient habituellement aussi des quantités considérables d'impuretés organiques ou inorganiques.

L'acide clavulanique ou son sel peut être transformé en un ester par les réactions d'estérification indiquées ci-dessous. Le procédé préféré de formation de l'ester requis de l'acide
20 clavulanique consiste à faire réagir un sel de l'acide clavulanique avec un agent d'estérification tel qu'un halogénure, un ester sulfonique réactif ou un agent équivalent. De telles réactions sont fréquemment effectuées dans un solvant organique à constante diélectrique élevée, tel que le diméthylformamide, le diméthyl-
25 formamide/acétone, le diméthylsulfoxyde, le N-méthylacétamide, l'hexaméthylphosphoramide et les solvants analogues.

Si désiré, le sel de l'acide clavulanique peut être dissous dans le solvant d'une manière classique, ou bien il peut être fixé sur un support polymère. Comme supports appropriés en vue
30 d'une utilisation dans le procédé selon l'invention, on peut mentionner les résines échangeuses d'anions à base forte, en particulier celles possédant une nature macroréticulaire, qui permet l'utilisation de systèmes de solvants non aqueux. On a trouvé que Amberlyst A 26 est approprié à cet effet. Le sel de l'acide
35 clavulanique peut être adsorbé sur la résine à partir du filtrat de culture et la résine peut alors être mise en suspension dans du diméthylformamide contenant de l'iodure de sodium et du bromure de benzyle. L'acide clavulanique peut, en variante, être élué sur une

colonne au moyen d'une solution d'iodure de sodium dans du diméthylformamide ou dans un mélange de diméthylformamide et d'acétone. L'acide clavulanique dans l'éluat est alors estérifié par addition de bromure de benzyle.

5 Lorsqu'il est formé, l'ester impur de l'acide clavulanique est normalement purifié par chromatographie. Dans de tels modes opératoires, l'ester est normalement dissous dans un solvant organique tel que l'acétate d'éthyle, le chlorure de méthylène, le chloroforme ou des solvants similaires. La phase solide utilisée
10 dans le procédé chromatographique est normalement une matière telle qu'un gel de silice ou un agent de filtration constitué par un gel, tel que Sephadex LH20 ou des matières chromatographiquement similaires.

 Les fractions sortant de la colonne peuvent être examinées,
15 en ce qui concerne la présence d'ester de l'acide clavulanique, en utilisant ses propriétés de synergie ou au moyen d'essais chimiques tels que la réaction avec le chlorure de triphényltétrazolium, conjointement à une chromatographie sur couche mince.

 Les fractions actives sont normalement combinées et on
20 évapore le solvant organique sous pression réduite.

 L'ester résultant de ce procédé est généralement d'une pureté acceptable, mais la matière peut être soumise à une nouvelle chromatographie, si désiré.

 Cet ester purifié de l'acide clavulanique peut être
25 transformé en acide clavulanique ou en sel de celui-ci par les procédés décrits dans le brevet belge n° 827 926.

 Un procédé particulièrement approprié de réobtention de l'acide clavulanique ou de ses sels consiste à hydrogéner son ester benzylique. Ces réactions ont normalement lieu en présence d'un
30 catalyseur formé par un métal de transition, en utilisant des pressions faibles ou moyennes d'hydrogène. La réaction peut être effectuée à température élevée, ambiante ou réduite, par exemple à une température comprise entre 0 et 100°C. Pour des conditions réactionnelles particulièrement appropriées à une telle hydrogéné-
35 tion, on utilise une pression d'hydrogène légèrement supérieure à la pression atmosphérique, à une température approximativement ambiante (12 à 20°C). La réaction peut être effectuée dans des solvants classiques tels que des alcanols inférieurs, par exemple

l'éthanol. On a trouvé qu'un catalyseur particulièrement approprié est constitué par du palladium sur du charbon.

Si l'hydrogénation est effectuée en présence d'une base, on obtient un sel de l'acide clavulanique ; on obtient par exemple le sel de lithium, de sodium ou de potassium si la réaction est effectuée en présence de bicarbonate de sodium ou de potassium, ou de carbonate de lithium, de sodium ou de potassium.

L'acide clavulanique ou le sel de celui-ci provenant d'une telle réaction est en général d'une bonne pureté, par exemple d'une pureté d'au moins 90%, et il peut habituellement être produit avec une pureté pratiquement totale.

Les exemples non limitatifs suivants décrivent l'invention plus en détails.

EXEMPLE 1

On a cultivé du Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 pendant 7 jours à 28°C sur des milieux nutritifs formés par des coins de gélose solide de la composition suivante :

Extrait de levure - Bacto (Difco)	4,0 g/l
Extrait de malt - Bacto (Difco)	10,0 g/l
Dextrose - Bacto (Difco)	4,0 g/l
Dissous dans l'eau distillée	
Régler à pH 7,3 et ajouter ensuite	
de la gélose - Bacto	20,0 g/l.

La culture enlevée par grattage de ce milieu nutritif sur coins a été utilisée directement pour l'inoculation de 100 ml de milieu d'ensemencement contenu dans des flacons coniques de 500 ml fermés avec des bouchons en mousse plastique. La composition du milieu d'ensemencement était la suivante :

Tryptone (Oxoid)	5,0 g/l
Extrait de levure	3,0 g/l

On a stérilisé le milieu avant l'inoculation par traitement à l'autoclave sous une pression de 1,05 kg/cm² à 121°C pendant 15 minutes. On a soumis à l'incubation le milieu d'ensemencement à 26°C pendant 65 heures sur un secoueur rotatif à 240 tours par minute, avec une excentration de 2,5 cm.

On a utilisé des portions de 5 ml du milieu d'ensemencement pour produire l'inoculation de portions de 100 ml d'un milieu de fermentation contenu dans des flacons coniques de 500 ml fermés

au moyen de bouchons en mousse.

On a utilisé trois milieux différents de fermentation, la composition des milieux étant la suivante :

5	<u>Milieu A</u>	Glucose	20 g/l
		Farine de graines de soja	10 g/l
		CaCO_3	0,2 g/l
		Na_2SO_4	0,5 g/l
		$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,001 g/l
		Complété avec de l'eau distillée.	
10	<u>Milieu B</u>	Dextrine	55 g/l
		Farine de graines de soja	20 g/l
		Mélasses	20 g/l
		NaH_2PO_4	1,3 g/l
		KCl	1,0 g/l
15		Complété avec de l'eau distillée	
20	<u>Milieu C</u>	Extrait de levure (Oxoïde)	10 g/l
		Scotasol	20 g/l
		Complété avec de l'eau distillée pH réglé à 7 avant stérilisation.	

(La farine de graines de soja est le produit vendu sous la dénomination commerciale Arkasoy 50, par British Arkday Co., Old Trafford à Manchester ; Scotasol est la matière soluble séchée de distillation de malt, vendue par Thomas Borthwick Ltd., 69 Wellington Street à Glasgow, Royaume-Uni. La dextrine est vendue par C.P.C. (U.K.) Ltd., Trafford Park, Manchester - Royaume-Uni).

Tous les milieux de fermentation ont été stérilisés avant l'inoculation par traitement à l'autoclave sous une pression de $1,05 \text{ kg/cm}^2$ à 121°C pendant 15 minutes.

On a soumis à l'incubation les flacons de fermentation à 26°C sur un secoueur rotatif à 240 tours par minute, avec une excentration de 2,5 cm. On a prélevé des échantillons de 5 ml aux flacons de fermentation dans des conditions stériles le deuxième jour de la fermentation et on a traité de la manière suivante :

On a soumis les échantillons à une centrifugation à 2200 g pendant 10 minutes et on a conservé la matière qui surnage. Cette matière surnageante s'est révélée comme ayant une activité d'inhibition vis-à-vis d'une préparation de β -lactamase de E. coli JT4 en utilisant un dosage d'inhibition standard de β -lactamase.

Un dosage approprié d'inhibition de la β -lactamase est décrit dans le brevet belge n° 827.926.

EXEMPLE 2

On a cultivé Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 dans un milieu A comme décrit dans l'exemple 1. On a prélevé des échantillons de 5 ml à des intervalles réguliers pendant toute la fermentation en utilisant une technique stérile. La matière surnageante obtenue par centrifugation de ces échantillons à 2200 g pendant 10 minutes a été testée en utilisant un certain nombre de modes opératoires décrits en détail ci-dessous.

(a) On a mesuré son activité antibactérienne vis-à-vis de Klebsiella aerogenes A par le test de diffusion dans la gélose à partir d'un trou creusé dans une plaque.

(b) On a mesuré son activité sur le système à la plaque de gélose KAG décrit dans le brevet belge n° 827.926.

Technique d'essai	Durée de fermentation (jours)			
	2	3	4	7
20 Diamètre de zone (mm) sur <u>Klebsiella aerogenes</u>	-	20,5	17,4	-
Diamètre de zone (mm) dans le système KAG	-	37,1	26,8	-

On a déposé localement des échantillons du quatrième jour de cette fermentation sur des bandes d'une largeur de 1 cm de papier pour chromatographie Whatman n° 1. Ces bandes ont été chromatographiées pendant la nuit à 4°C dans les systèmes solvants suivants :

n-butanol/éthanol/eau 4:1:5 en volume/volume (phase supérieure)
n-butanol/acide acétique/eau 12:3:5 en volume/volume.

Les bandes de papier ont été séchées et disposées sur des plaques de géloseensemencées avec Klebsiella aerogenes NCTC 418 et contenant de la pénicilline G (plaques KAG). Après incubation des plaques pendant 16 heures à 28°C, on a constaté des zones d'inhibition de croissance.

Dans les deux systèmes solvants, on a constaté une seule zone d'inhibition à R_F 0,72 dans le système butanol/acide acétique/

eau et à R_F 0,25 dans le système butanol/éthanol/eau. Les R_F ont été les mêmes que ceux d'un échantillon authentique d'acide clavulanique lorsqu'on l'utilise dans le même système.

EXEMPLE 3

5 On a cultivé Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 pendant 7 jours à 26°C sur un milieu nutritif constitué par de la gélose solide en coins contenue dans des bouteilles de Roux. Le milieu de gélose était :

10 Levure-extrait de malt-gélose Bacto
(milieu IS -2)
(Laboratoires Difco à Détroit, Michigan aux E.U.A.).
On a ajouté de l'eau stérile désionisée (100 ml) contenant 0,05% de Triton X (agent tensio-actif) dans une bouteille de Roux, on a gratté la surface de la culture de manière à produire une
15 suspension de spores et de mycélium. On a utilisé la suspension (100 ml) pour effectuer l'inoculation du milieu d'ensemencement (50 litres) contenu dans un fermenteur de 90 litres en acier inoxydable équipé entièrement avec des chicanes.

20 Le milieu d'ensemencement avait la composition suivante :
Tryptone (Oxoid) g/l 5,0
Extrait de levure (Oxoid) 3,0
Agent anti-mousse 0,5

On complète avec de l'eau du robinet.
(L'agent anti-mousse consistait en 10% de Pluronic L81
25 (Ugine Kuhlmann Chemicals Ltd) dispersé dans de l'huile de graines de soja (British Oil & Cake Mills).

On a stérilisé le milieu à la vapeur d'eau dans le fermenteur avant l'inoculation.

30 Après l'inoculation, on a agité le milieu d'ensemencement en utilisant un rotor à ailettes de 12,5 cm, entraîné à 240 tours par minute ; on a alimenté en air stérile à raison de 50 litres/minute et on a maintenu la température à 26°C. On a poursuivi le développement du milieu d'ensemencement pendant 48 heures.

35 On a utilisé 7,5 litres du milieu d'ensemencement pour l'inoculation de 150 litres de milieu de fermentation contenu dans un fermenteur en acier inoxydable de 300 litres, entièrement à chicanes.

Le milieu de fermentation avait la composition suivante :

		g/l
	Glucose monohydraté	10,0
	Farine de graines de soja	10,0
	CaCO_3	0,2
5	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,001
	Na_2SO_4	0,5
	Agent anti-mousse	0,5

Complété avec de l'eau du robinet.

(La farine de graines de soja était de l'Arkasoy 50, vendu par
10 British Arkady Co., Ltd, Old Trafford, Manchester).

L'agent anti-mousse était le même que celui utilisé dans le milieu d'ensemencement.

On a stérilisé à la vapeur d'eau le milieu contenu dans le fermenteur avant l'inoculation.

15 Après l'inoculation, on a agité le milieu de fermentation en utilisant un rotor à ailettes d'un diamètre de 21,5 cm, entraîné à 340 tours par minute. On a alimenté en air stérile à raison de 150 litres/minute et on a maintenu la température à 26°C pendant toute la fermentation de 72 heures.

20 On a clarifié tout le moût de fermentation par centrifugation et on a réglé le liquide clarifié (140 l) à pH 6,2. On a fait passer le moût clarifié sur une résine échangeuse d'anions fortement basique de Zerolit FF (ip) SRA61 (15 x 130 cm) (Zerolit Ltd U.K.) avec un débit de 500 ml/minute. On a lavé la colonne avec de l'eau
25 déminéralisée refroidie (15 litres) avec un débit de 500 ml/minute et on a ensuite élué avec une solution aqueuse de NaCl 1M avec un débit identique, et on a recueilli des fractions de 4 litres. On a contrôlé les fractions en utilisant la technique de titrage biologique standard du trou dans une plaque sur le système de plaque KAG.
30 On a combiné les fractions (2 à 19) donnant une bonne activité sur le système KAG. On a réglé les fractions combinées à pH 6,2 et on a refroidi et on a fait passer sur une colonne d'Amberlite XAD-4 (30 x 125 cm). (Rohm & Haas, Philadelphie, U.S.A.) avec un débit de 500 ml/minute. On a lavé la colonne avec une solution refroidie de
35 NaCl 1M (5 litres) et on a alors élué avec de l'eau déminéralisée, à 5°C et avec un débit de 500 ml/minute. On a recueilli des fractions de 5 litres en commençant juste avant l'élution complète de la solution de NaCl de la colonne. On a combiné les fractions 3 à

9 contenant de l'acide clavulanique.

On a concentré les fractions combinées (35 l) en réduisant de 10 fois le volume par osmose inverse (Module de laboratoire De Danske Sukkerfabrikker, membrane de type 995). Le mode opératoire consistait à faire recirculer la matière retenue à partir d'un réservoir en acier inoxydable équipé d'un système de refroidissement la soupape de sortie de l'unité d'ultrafiltration étant réglée de manière à donner une pression différentielle de 45 atmosphères à travers les 40 membranes. La température a été maintenue à une valeur comprise entre 2 et 5°C et le pH à $6,8 \pm 0,1$ par addition de HCl 2N. On a séché le concentré résultant (3,5 l) avec obtention d'un solide brun amorphe (34 g).

On a purifié 2 g de ce solide amorphe par le procédé de l'exemple 17 du brevet belge n° 827 926, avec obtention de clavulanate de sodium tétrahydraté cristallin sensiblement pur. On a traité 32 g du solide amorphe avec du bromure de benzyle (10 ml) et du diméthylformamide (35 ml) et on a agité le mélange à la température ambiante pendant 4 heures. On a éliminé le solvant sous vide avec obtention d'un résidu semi-solide. On a ajouté de l'acétate d'éthyle (50 ml) et on a éliminé la matière solide par filtration. On a évaporé le filtrat sous vide avec obtention d'une huile.

On a préparé une colonne Séphadex LH20 (3,8 x 34 cm) (Pharmacia Ltd.) dans un mélange de cyclohexane/chloroforme 1:1. On a dissous le produit de la benzylation dans un minimum du mélange de cyclohexane/chloroforme 1:1 et on a fait passer sur la colonne, qu'on a éluée avec le même mélange solvant. On a jeté les premiers 150 ml d'éluant et ensuite on a recueilli des fractions de 25 ml. On a vérifié la présence de clavulanate de benzyle par dépôt localisé d'échantillons de 5 μ l de chaque fraction sur des plaques constituées par des couches minces de gel de silice et on a développé les plaques dans un mélange de cyclohexane/acétate d'éthyle 1:1. On a rendu visible le clavulanate de benzyle par pulvérisation d'un réactif constitué par du chlorure de triphényltétrazolium. On a comparé le R_f avec celui d'un échantillon authentique de clavulanate de benzyle chromatographié dans les mêmes conditions. (On prépare le réactif formé de chlorure de triphényltétrazolium en mélangeant une partie d'une solution méthanolique à 4% de chlorure de triphényltétrazolium avec une

partie de soude caustique 1N).

On a combiné les fractions (30 à 45) contenant du clavulanate de benzyle et on a évaporé sous pression réduite avec obtention d'une huile.

- 5 On a dissous le produit provenant de la colonne Séphadex LH20 dans un minimum de mélange de cyclohexane/acétate d'éthyle 1/1 et on a fait passer sur une colonne de gel de silice (2,5 x 28 cm) (Gel de silice Merck H de qualité pour chromatographie sur couche mince), préparée dans le même solvant. On a élué la colonne avec un
- 10 mélange de cyclohexane/acétate d'éthyle 1/1 et on a recueilli 28 fractions de 7 ml de volume, puis des fractions de 15 ml. Les fractions (31 à 33) donnant une couleur rouge lors d'un dépôt localisé sur des plaques de chromatographie en couche mince de gel de silice et d'une pulvérisation du réactif formé de chlorure de
- 15 triphényltétrazolium ont été combinées et évaporées sous pression réduite. L'huile résultante a été soumise à des tests de spectroscopie RMN et IR et les spectres obtenus ont été identiques à ceux obtenus au moyen d'un échantillon authentique de clavulanate de benzyle.

20

EXEMPLE 4

Préparation de clavulanate de sodium

- On a soumis à l'hydrogénation du clavulanate de benzyle (0,5 g de l'exemple 3) dans de l'éthanol (20 ml) et de l'eau (5 ml) sur un catalyseur à 10% de palladium sur charbon (0,13 g) et du
- 25 bicarbonate de sodium (0,15 g) pendant 25 minutes à la température ambiante et à la pression atmosphérique. On a filtré le catalyseur on a lavé à l'eau et on a évaporé l'éthanol et les filtrats combinés sous vide. Le produit recherché a cristallisé dans un mélange d'eau-acétone sous forme de clavulanate de sodium tétrahydraté.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'acide clavulanique et de ses sels, caractérisé en ce qu'on effectue la culture d'une souche de Streptomyces jumonjinensis et en ce qu'on récupère l'acide clavulanique ou ses sels à partir de la culture.
5
2. Procédé de préparation d'acide clavulanique et de ses sels, caractérisé en ce qu'on effectue la culture de Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 ou d'un mutant de celui-ci à rendement élevé.
- 10 3. Procédé suivant la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on prépare un sel solide de lithium, sodium, potassium, calcium, magnésium, baryum, aluminium, ammonium ou ammonium substitué de l'acide clavulanique.
- 15 4. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce qu'on prépare le clavulanate de sodium tétrahydraté cristallisé ou le sel de potassium cristallisé ou le sel de lithium cristallisé.
- 20 5. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on cultive une souche de Streptomyces jumonjinensis et ensuite on prélève les cellules de Streptomyces jumonjinensis au milieu de fermentation et on extrait le filtrat de la culture résultante de manière à obtenir de l'acide clavulanique ou un sel de celui-ci.
- 25 6. Procédé suivant la revendication 5, caractérisé en ce que l'acide clavulanique ou son sel est extrait par un solvant du filtrat de culture.
- 30 7. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce que le filtrat de culture est refroidi et le pH du filtrat de culture est réglé à pH 2-3, puis on extrait d'abord l'acide clavulanique qui s'y trouve au moyen d'un solvant organique non miscible à l'eau, et ensuite on extrait à nouveau au moyen de bicarbonate de sodium aqueux, d'un tampon au phosphate acide de potassium, d'une suspension de carbonate de calcium ou d'eau dont le pH est maintenu sensiblement à la neutralité, et on récupère l'acide clavulanique ou son sel à partir de l'extrait aqueux
35 résultant.
8. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce que le filtrat de culture est mis en contact avec une phase organique dans laquelle est dissoute une amine insoluble dans l'eau,

l'acide clavulanique étant ainsi extrait par la phase organique sous forme de sel d'amine, et ensuite on extrait à nouveau l'acide clavulanique par une solution aqueuse d'un sel de métal alcalin et on récupère l'acide clavulanique ou son sel à partir des extraits
5 aqueux.

9. Procédé suivant la revendication 5, caractérisé en ce que l'acide clavulanique ou son sel est extrait du filtrat de la culture par des procédés basés sur la nature anionique de l'acide clavulanique.

10 10. Procédé suivant la revendication 9, caractérisé en ce que le filtrat de culture est mis en contact à pH 6-7 avec une résine échangeuse d'anions à base faible ou forte jusqu'à ce que la résine soit saturée d'acide clavulanique et ensuite on élue avec une solution saline aqueuse et on récupère un sel de l'acide
15 clavulanique à partir de l'éluant.

11. Procédé suivant la revendication 5, caractérisé en ce qu'on fait passer une solution aqueuse formée par le filtrat de culture à travers un lit de charbon, en ce qu'on lave ensuite à l'eau et qu'on élue avec un solvant aqueux miscible à l'eau.

20 12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 5 à 11, caractérisé en ce qu'on effectue le stade supplémentaire consistant à relarguer ou à précipiter un sel insoluble dans l'eau de l'acide clavulanique.

25 13. Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce ce que le sel insoluble dans l'eau de l'acide clavulanique est du clavulanate de lithium.

14. Procédé suivant la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que la précipitation est effectuée en ajoutant un solvant insoluble dans l'eau à une solution aqueuse du sel
30 relativement insoluble dans l'eau de l'acide clavulanique.

15. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce que le relargage du clavulanate de lithium a lieu dans une solution aqueuse de clavulanate de lithium en présence d'un composé de lithium ionique, par augmentation de la concentration des ions
35 lithium dans la solution, de telle sorte que la solubilité du clavulanate de lithium soit fortement dépassée à la température concernée.

16. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 5 à 15, caractérisé en ce qu'on effectue un stade supplémentaire consistant à former un ester de l'acide clavulanique d'une manière classique, à purifier l'ester et à régénérer ensuite l'acide clavulanique ou son sel à partir de l'ester.

17. Procédé suivant la revendication 16, caractérisé en ce que l'ester de l'acide clavulanique est formé par réaction d'un sel de l'acide clavulanique avec un halogénure ou un ester sulfonique réactif.

10 18. Procédé suivant la revendication 17, caractérisé en ce que l'halogénure réactif est du bromure de benzyle.

19. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisé en ce que l'acide clavulanique ou son sel est régénéré à partir de l'ester par hydrogénolyse.

15 20. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 5 à 19, caractérisé en ce qu'on effectue en outre une purification supplémentaire de l'acide clavulanique ou de son sel par chromatographie sur une colonne échangeuse d'ions.

21. Acide clavulanique et ses sels préparés par le procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 20.